



Identificação molecular de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* nas variedades RB 863129 e RB 92579 de cana-de-açúcar submetidas à termoterapia

Molecular identification of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in varieties RB 863129 and RB 92579 of sugarcane under thermotherapy

Felipe Lira de Sá Cavalcanti^a, Fabio Ribeiro Garcia^b, Robson Antonio de Souza^a, Laureen Michelle Houllou^a

^a Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste-CETENE. Av. Prof. Luís Freire, n. 01, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil. CEP: 50.740-540. E-mail: lipelsc@gmail.com.

^b Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará-IFPA. Av. Marechal Castelo Branco, n. 621, Interventória, Santarém-PA, Brasil. CEP: 68020-570.

ARTICLE INFO

Recebido 30 Out 2019
Aceito 15 Abr 2020
Publicado Dia Mês Ano

ABSTRACT

Sugarcane cultivation is one of the most important agricultural activities in Brazil, currently occupying the 3rd place in planted areas in the country. Despite the country's sugarcane economic importance, crop development is limited by the ratoon stunting disease (RSD), the main crop disease caused by the *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). The most widespread control technique of RSD is the sugarcane stalks thermotherapy. The study aimed to evaluate the sugarcane (varieties RB 863129 and RB 92579) stalks thermotherapy effectiveness on Lxx control. The sugarcane stalks were subjected to a combination of temperature and time treatments, which consisted of 30 minutes at 52°C, 2 hours at 50°C, and a control treatment (not heat-treated). Then, the sugarcane stalks were grown in boxes, containing Basaplant[®] substrate and transferred to the greenhouse, by 50 days. After this period, the total percentage of shoot emission and plant health were evaluated concerning the presence of Lxx genomic DNA. Under the conditions of this study, it was found that for RB 863129 and RB 92579 sugarcane varieties, all the treatments tested presented PCR amplification for Lxx, as well, the development of the shoots was compromised.

Keywords: *Saccharum officinarum*, ratoon stunting disease, heat treatment, diagnosis.

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar é uma das mais importantes atividades agrícolas do Brasil, ocupando atualmente a 3ª colocação em área plantada no país. Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar para o país, o crescimento da cultura é limitado pelo raquitismo-da-soqueira, principal doença da cultura, causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx). A técnica mais difundida para o controle do raquitismo-da-soqueira é a termoterapia de rebolos. O estudo objetivou avaliar a efetividade da termoterapia de rebolos para o controle de Lxx nas variedades RB 863129 e RB 92579 de cana-de-açúcar. Os rebolos foram submetidos aos tratamentos de combinação de temperatura e tempo, que consistiu em 52°C por 30 minutos, 50°C por 2 horas e um tratamento controle, onde os rebolos não foram submetidos a tratamento térmico. Em seguida, os rebolos foram cultivados em caixas contendo substrato Basaplant[®] e transferidos para a estufa, onde permaneceram por 50 dias. Após este período, foi avaliada a porcentagem total de emissão de brotações e a fitossanidade em relação à presença de DNA genômico de Lxx. Nas condições deste estudo foi verificado que, para as variedades RB 863129 e RB 92579 de cana-de-açúcar, todos os tratamentos testados foram diagnosticados como positivos para Lxx, bem como, comprometeram a emissão de brotações.

Palavras-Chave: *Saccharum officinarum*, raquitismo-da-soqueira, tratamento térmico, diagnose.

Introdução

A cultura da cana-de-açúcar representa uma importante fonte de matéria-prima para as indústrias de açúcar e etanol. Para o setor de biocombustíveis, ainda se espera um aumento significativo na demanda de etanol, considerando seu potencial mais sustentável como substituto dos combustíveis fósseis e de reduzir as emissões de gases (Goldemberg et al., 2014).

Na safra de 2019, cerca de 642,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram produzidas no Brasil, sendo o Estado de São Paulo o principal produtor, seguido por Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas e Pernambuco, com 12,09 milhões de toneladas (CONAB, 2019), sendo as características de solo e clima da região, fatores que interferem positivamente na produtividade da cana-de-açúcar (Simões Neto et al., 2015).

O raquitismo-de-soqueira (RSD), causado pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é considerada a principal patologia em cana-de-açúcar, sendo responsável por perdas na produção que podem exceder 50%, a depender da concentração do patógeno nos vasos condutores da planta (Dias, Carrer Filho & Cunha, 2019).

A ausência de variedades resistentes ao RSD e a falta de sintomas em plantas infectadas pela Lxx dificultam o diagnóstico e, consequentemente, a identificação correta da fitobactéria e o seu real impacto sobre o setor produtivo.

Como se trata de uma doença que se dissemina no campo, através do contato de plantas saudáveis com o fluido vascular de plantas infectadas, os métodos de controle incluem a desinfestação de instrumentos de corte e técnicas de manejo como o tratamento térmico dos rebolos antes do plantio e o cultivo *in vitro* a partir de meristemas (Dias, Carrer Filho & Cunha, 2019; Garcia et al., 2019; Hoy et al., 2003; Sandhu et al., 2009).

A termoterapia é a técnica mais difundida para o tratamento de rebolos de cana-de-açúcar, onde, as duas metodologias mais empregadas no Brasil são, 52°C por 30 minutos (Copersucar, 1989) e 50°C por 2 horas (Damann & Benda, 1983).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do tratamento térmico de rebolos para o controle de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) e os efeitos da termoterapia na emissão de brotações em rebolos das variedades RB 863129 e RB 92579 de cana-de-açúcar.

Material e Métodos

Para a condução do experimento, rebolos das variedades RB 863129 e RB 92579 foram coletados no mês de março de 2018 na Estação Experimental de Cana-de-açúcar do Carpina, localizada no município de Carpina, Pernambuco. O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisas Aplicada à Biofábricas (LAPAB), do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), onde, com o auxílio de esponja e detergente, os rebolos foram lavados para a retirada da cera epicuticular presente na superfície, visando evidenciar a coloração e garantir a assepsia do material vegetal a ser utilizado em laboratório.

Depois de lavados, os rebolos foram acondicionados em saco de raschel de nylon e, após imersão em tanque térmico, foram submetidos a dois tratamentos de termoterapia, sendo (T2) com 52°C por 30 minutos, (T3) com 50°C por 2 horas e (T1) tratamento controle, no qual os rebolos não foram submetidos a tratamento térmico.

Após o procedimento de termoterapia, os rebolos foram cultivados em caixas plásticas contendo 3 centímetros de substrato Basaplant Florestal®, de forma que as gemas laterais ficassem voltadas para cima, e em seguida, os rebolos foram cobertos com uma camada de 2 cm do mesmo substrato. Após o acondicionamento, as caixas plásticas foram transferidas para a estufa de aclimatização de plantas, onde permaneceram por 50 dias. Após este período, foi avaliada a porcentagem total de rebolos que emitiram brotações (%). Para a determinação do índice de velocidade de emissão de brotação, a cada dois dias, foi avaliado o número de brotações emitidas, determinado pela equação: $IVB = (B1/D1 + B2/D2 + B3/D3 + \dots + Bn/Dn)$, onde Bn é o número de brotações verificadas nas contagens e Dn é o número de dias de cultivo dos rebolos.

Para cada tratamento foram utilizadas 40 repetições, sendo que cada repetição foi constituída de 1 rebolo com 6 centímetros de comprimento, contendo uma gema cada.

Para a avaliação quanto à presença de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), no material vegetal submetido aos tratamentos térmicos, foram utilizados fragmentos de folhas das mudas recém brotadas. Em câmara de fluxo laminar, com o auxílio de bisturi estéril, as folhas foram cortadas e pesadas, até 100 mg por microtubo. Em seguida as amostras foram congeladas com nitrogênio líquido e maceradas via Tissue Lyser (Qiagen).

As amostras foram então submetidas à extração de DNA por meio do Kit Wizard®

Genomic DNA Purification Kit (Promega) e depois à corrida em gel de agarose a 1% para avaliação da qualidade do DNA extraído. Por fim, o material foi quantificado por espectrofotometria em Nanodrop.

Quanto à identificação molecular do patógeno, foram utilizados os *primers* LxxW.1 (5' CAGAGCACCATCGTGAAGAC 3') e LxxW.2 (5' AAGGACAAGTCCACCAAGGA 3'), específicos para Lxx. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos, extensão de 72°C por 60 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Dantas et al., 2017).

Após cada ensaio de reação de PCR, os amplicons foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, e visualizados com o auxílio de transiluminador com luz ultravioleta. Os amplicons gerados foram visualizados na forma de bandas e consideradas positivas para Lxx as amostras que apresentaram fragmento correspondente a 182 pb, utilizando, como comparação, um marcador de peso molecular de 100 pb.

Os resultados indicaram que todas as amostras submetidas ao tratamento térmico se mostraram positivas na PCR para Lxx (Figura 1), independente do tratamento utilizado, indicando que a termoterapia, apesar de largamente utilizada por ter o potencial de desnaturar as proteínas das células bacterianas (Dias, Carrer Filho & Cunha, 2019), não se mostrou eficiente para a eliminação de Lxx e controle do raquitismo-da-soqueira. Isso pode ser devido às temperaturas consideradas baixas para penetração de calor no interior do rebolo, insuficientes, portanto, para a eliminação do microrganismo endofítico.

Neste estudo, a PCR convencional mostrou alta sensibilidade na detecção de DNA de Lxx a partir de folhas jovens (50 dias) de cana-de-açúcar submetida aos tratamentos, ao contrário do que foi observado por Dias, Carrer Filho & Cunha (2019), que obteve resultados falso negativos por este método quando extraiu o DNA a partir do fluido vascular de cana-de-açúcar após nove meses de cultivo em campo. Isso mostra que a fonte do material biológico a ser testado e o tempo de vida da planta podem influenciar na eficiência da diagnose e são fatores que devem ser levados em consideração na escolha do método mais adequado de análise.

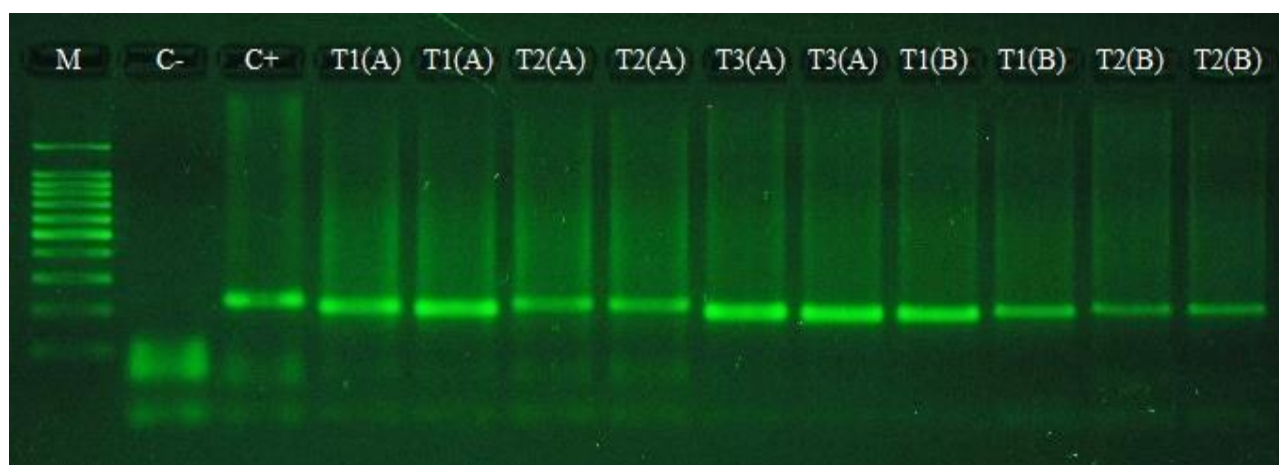
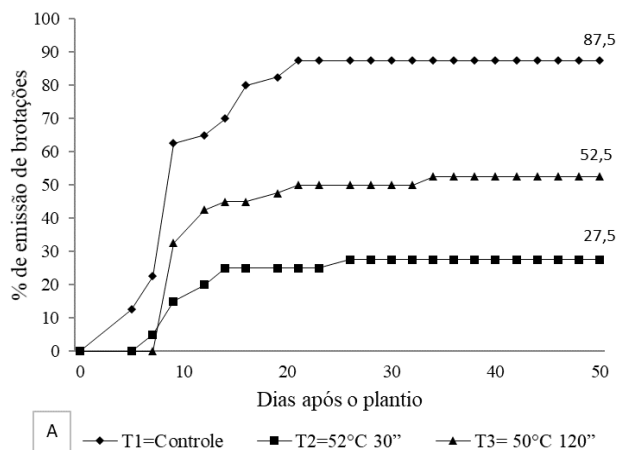


Figura 1. Foto de gel de eletroforese da PCR para Lxx do material foliar de cana-de-açúcar regenerada após os tratamentos de termoterapia. M= marcador de peso molecular; C- = controle negativo; C+ = controle positivo; T1= controle sem tratamento térmico; T2= 52°C/30'; T3= 50°C/2h. A= RB 863129; B= RB 92579.

Para as variedades avaliadas neste estudo, foi observado que o tratamento térmico teve influência sobre o percentual de brotações emitidas, sendo verificado efeito deletério para a porcentagem de emissão de brotações quando os rebolos foram submetidos a tratamento térmico, independente da variedade (Figura 2). A porcentagem de emissão de brotações oriundas de rebolos tratados termicamente foi inferior quando comparada com a porcentagem de brotações de rebolos que não foram submetidos à termoterapia,

sendo verificado o valor máximo de 87,5 e 85% de emissão de brotações para as variedades RB 863129 e RB 92579, respectivamente. Assim, o tratamento térmico se mostrou prejudicial para esta variável. Este comportamento também foi reportado por Fernandes Júnior et al (2010), que verificaram decréscimo de 30% no percentual de emissão de brotações quando submeteram a variedade CB 49-206 ao tratamento de 50°C por 2 h. Ainda, Urashima & Grachet (2012) relataram decréscimo de até 50% para emissão de brotação

para a variedade RB 935744, quando submetida



ao tratamento térmico a 50°C por 2 h.

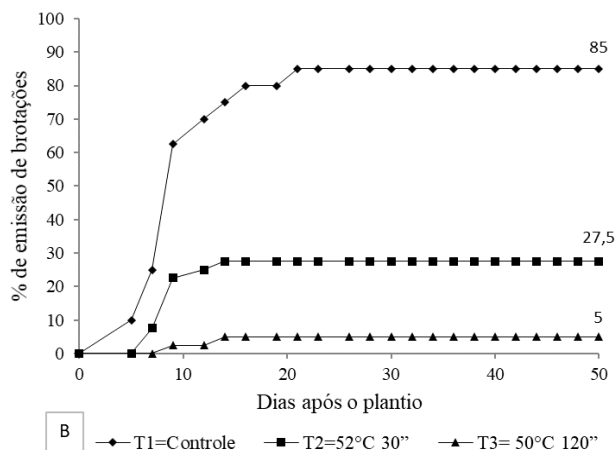


Figura 2. Porcentagem de emissão de brotações em função de diferentes tratamentos térmicos ao longo de 50 dias após o plantio, em rebolos de cana-de-açúcar das variedades RB 863129 (A) e RB 92579 (B).

Neste estudo, foi verificado que o tratamento T2, onde os rebolos foram submetidos a temperatura de 52°C por 30 minutos, apresentaram 27,5% de emissão de brotação, independente da variedade, porém, no tratamento T3, onde foram submetidos a 50°C por 2 horas, as variedades estudadas apresentaram comportamentos distintos, onde, foi verificado 52,5% de emissão de brotações para a variedade RB 863129, porém, para a variedade RB 92579, foi verificado apenas 5% de emissão de brotações, além do fato que estas vieram posteriormente à morte, o que inviabilizou a coleta de material vegetal para a diagnose molecular neste tratamento em específico (Figura 1).

Portanto, dependendo da variedade, um mesmo tratamento térmico pode apresentar respostas distintas, determinado pelas características genéticas, podendo ser tanto benéfico, quanto deletério sobre as características morfológicas das brotações (Benda, 1994; Fernandes Júnior et al., 2010).

Conclusão

Apesar de a termoterapia ser amplamente utilizada para tratamento de rebolos, foi verificado que, para as duas variedades de cana-de-açúcar testadas, os tratamentos não foram capazes de eliminar a Lxx. Além disso, a termoterapia mostrou efeito deletério, comprometendo a emissão de brotações.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento (Chamada MCTIC/CNPq N° 28/2018 - Universal/Faixa A, Processo: 425068/2018-8), pela concessão de

bolsa PCI aos pesquisadores e à Estação Experimental de Cana-de-Açúcar do Carpina, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (EECAC-UFRPE), por ceder parte do material vegetal utilizado.

Referências

- Benda, G. T. A. 1994. Serial hot-water treatment for sugarcane disease control. In: Rao, G. P.; Gillaspie Jr., A. G.; Upadhyaya, P. P.; Bergamin Filho, A.; Agnihotri, V. P.; Chen, C. T. (Eds.). Current trends in sugarcane pathology. New Delhi. International Books and Periodicals Supply Service, 297-310.
- CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. 2019. 1, Brasília: Conab, 2019, v.6. n° 1, v. 4, Safra 2019/20, n. 1.
- Copersucar. 1989. Binômio tempo x temperatura no controle do raquitismo da soqueira (RSD) da cana-de-açúcar, pelo processo de termoterapia em gemas isoladas. Cadernos COPERSUCAR, Série Melhoramento, 25, 1-5.
- Damann Jr., K. E.; Benda, G. T. A. 1983. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease. Plant Disease, 67, 966-967. doi: 10.1094/pd-67-96.
- Dantas, P. V. P.; Melo, C. F.; Houllou, L. M.; Machado, G. 2017. Nanoparticle-assisted Polymerase Chain Reaction (NanoPCR): Optimization of PCR detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by the addition of nanoparticles. Journal of Applied and Advanced Research, 2, 13-20. doi: 10.21839/jaar.2017.v2.i1.47

- Dias, V.; Carrer Filho, R.; Cunha, M. G. 2019. Comparison of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* molecular detection in heat-treated sugarcane setts. *Agricultural Research in the Tropics*, 49, e55132. doi: 10.1590/1983-40632019v4955132.
- Fernandes Júnior, A.; Ganem Júnior, E. J.; Marchetti, L. B. L.; Urashima, A. S. 2010. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. *Tropical Plant Pathology*, 35, 116-120. doi: 10.1590/S1982-56762010000100011.
- Garcia, F. R.; Cavalcanti, F. L. S.; Souza, R. A.; Hollou, L. M. 2019. Kasugamycin on *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in the *in vitro* culture of sugarcane. *Ciência Rural*, 49, 1-5. doi: 10.1590/0103-8478cr20181009.
- Hoy, J. W.; Bischoff, K. P.; Milligan, S. B.; Gravois, K. A. 2003. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. *Euphytica*, 129, 237-240. doi: 10.1023/A:1021928823445.
- Sandhu, S. K.; Gosal, S. S.; Thind, K. S. et al. 2009. Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. *Sugar Tech.*, 11, 34-38. doi: 10.1007/s12355-009-0006-8.
- Simões Neto, D. E.; Oliveira, A. C.; Freire, F. J.; Freire, M. B. G. S.; Oliveira, E. C. A.; Rocha, A. T. 2015. Adubação fosfatada para cana-de-açúcar em solos representativos para o cultivo da espécie no Nordeste brasileiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 50, 73-81. doi: 10.1590/S0100-204X201500010008.
- Urashima, A. S.; Marchetti, L. B. L. 2013. Incidence and Severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in São Paulo State, Brazil. *Journal of Phytopathology*, 161, 478-484. doi: 10.1111/jph.12093.